

Exhibit 20

ANTITUMOR AGENT**Publication number:** JP1180830**Publication date:** 1989-07-18**Inventor:** ISHIDA NAKAO; MAJIMA TOSHIRO; KAMIYA HIDEHIKO; ITO KUNIHIKO**Applicant:** KAYAKU KK**Classification:****- international:** A61K35/66; A61K35/74; A61P35/00; A61K35/66; A61P35/00; (IPC1-7): A61K35/66**- European:****Application number:** JP19880003299 19880111**Priority number(s):** JP19880003299 19880111[Report a data error here](#)**Abstract of JP1180830**

PURPOSE: To obtain an effective antitumor agent having high safety, by subjecting live microbial cells of a bacterium belonging to the genus *Listeria* to inactivation treatment. **CONSTITUTION:** An antitumor agent obtained by inactivating infectivity of live microbial cells of *Listeria monocytogenes* EGD strain (ATCC 15313) or U-T strain (ATCC 19115). The inactivation is carried out by a method for treating the live microbial cells at 37-45 deg.C temperature in a physiological saline solution of penicillin G potassium salt in 20,000-30,000 units/ml concentration for 1hr or adding chloroform in an amount almost equal to that of an aqueous physiological saline solution of the live microbial cells, vigorously stirring the solution, separating the microbial cells by centrifugation, etc., and sonicating the separated microbial cells for several min, etc. The dose of the above-mentioned antitumor agent is normally about 0.02-0.5mg/kg/day and preferably subcutaneously or intramuscularly administered once a day.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑯ 公開特許公報 (A)

平1-180830

⑮ Int. Cl. 4

A 61 K 35/66

識別記号

ADU

府内整理番号

8213-4C

⑯ 公開 平成1年(1989)7月18日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全4頁)

⑯ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑰ 特願 昭63-3299

⑰ 出願 昭63(1988)1月11日

⑰ 発明者 石田 名香雄 宮城県仙台市角五郎1丁目5-40

⑰ 発明者 馬島 敏郎 宮城県仙台市八幡5丁目6-22 佐重ハイツ402号

⑰ 発明者 神谷 英彦 宮城県仙台市八幡4丁目1-43-204

⑰ 発明者 伊藤 邦彦 宮城県仙台市郡山字源兵衛西13-4

⑰ 出願人 株式会社科薬 東京都板橋区舟渡2丁目8番16号

⑰ 代理人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明細書

〔産業上の利用分野〕

1. 発明の名称

抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

1. リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) EGD 株または 4b 株の生菌体の感染能を不活化してなる抗腫瘍剤。

2. 不活化が、生菌体をペニシリン処理することにより行なわれたものである特許請求の範囲第1項記載の抗腫瘍剤。

3. 不活化が、生菌体をクロロフオルム処理及びソニケーション処理に付すことにより行なわれたものである特許請求の範囲第1項記載の抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、リステリア (Listeria) 菌生菌体を不活化処理して成る有効かつ安全性の高い抗腫瘍剤に関する。

〔従来の技術及び課題〕

抗腫瘍剤の出現により癌治療の成績は年々向上しているが、未だに癌による死亡数は多く、更に有効な抗腫瘍剤の提供が要望されている。特に、従来の抗腫瘍剤の多くは感染症の発現等、副作用が強く、このため治療が充分に行なえない場合が多いのが現状である。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる実情において有効かつ安全性の高い抗腫瘍剤を提供すべく鋭意研究を行なつた結果、リステリア菌の生菌体を

不活化処理することにより該条件を満足する抗腫瘍剤が得られることを見い出し、本発明を完成了。

すなわち本発明は、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) EGD 株 (ATCC 15313) または 4b 株 (ATCC 19115) の生菌体の感染能を不活化してなる抗腫瘍剤を提供するものである。

本発明に用いられるリステリア菌は、非病原性のグラム陽性桿菌であり、マクロファージ内で生息する細胞性細菌であるため、マクロファージの機能等に関する研究に世界的に用いられている。

本発明はこのリステリア菌を不活化することにより得られた菌体に抗腫瘍性を認めたも

のであり、不活化手段としては例えば生菌体をペニシリン処理に付す方法、生菌体をクロロフォルム処理及びソニケーション処理に付す方法等が挙げられる。

ペニシリンによる処理は、例えば生菌体をペニシリン G カリウム塩の 2~3 万単位/ml 生理食塩水溶液中、37~45℃ の温度で約 1 時間処理することによつて行なわれる。

クロロフォルム処理とソニケーション処理に付す場合は、例えば生菌体の生理食塩水溶液にこれとほぼ等量のクロロフォルムを加えて激しく攪拌した後、遠心分離等によつて菌体を分離し、これを数分間ソニケーションすることによつて行なわれる。

本発明においては、このようにして処理さ

- 3 -

れた菌に感染性のないことを、寒天プレート上でコロニーを形成しないことで確認した。

かくして得られた本発明の抗腫瘍剤の投与量は、症状に応じて増減するのが好ましいが、通常 0.02~0.5 mg/kg/日 程度であり、1 日 1 回皮下または筋肉内に投与するのが好ましい。

〔実施例〕

以下に実施例を挙げて更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地に、リステリア菌 (ATCC-15313 または ATCC-19115) を培養 (静置の場合 37

- 4 -

℃, 15 時間; 振盪培養の場合 7.5 時間) し、得られた菌体をペレットにした。これを、ペニシリン G カリウム塩 27000 単位/ml を含む生理食塩水に 10^9 個/ml となるよう懸濁し、37℃ で 20 分間、次いで 45℃ で 30 分間加温処理した。得られた懸濁液を適当な濃度に希釈し、-80℃ にて冷凍保存した。

試験例 1 急性毒性試験

一群 5 匹の雄 BALB/c 及び雄 ddY マウスを用い、急性毒性試験を行なつた。マウス腹腔に、実施例 1 で得られた不活化リステリア菌 1×10^8 個を投与したところ、2 週間の時点まで全てのマウスが生存した。一方、対照として用いたリステリア生菌の LD₅₀ は、 10^5 個 (ATCC-15313) 及び 10^7 個 (ATCC-19115)

であつた。

試験例 2 抗腫瘍性試験

一群 8 匹の BALB/c 雄マウス (7 週令) の皮内に、 1×10^6 個の Meth A 細胞を移植した。3 日後、実施例 1 で得られた不活化リスティニア菌 5×10^6 個/日を腫瘍内に 3 日間連続投与したところ、明らかに腫瘍の増殖を抑え、またマウスも延命した。この結果を第 1 図に示す。

実施例 2

実施例 1 と同様にして培養したリスティニア生菌体をペレットにし、生理食塩水に懸濁した。これに再蒸留したクロロフォルムを等量加え、室温にて激しく攪拌後、3000 r.p.m. で 30 分間遠心を行なつた。得られた菌体を

蒸留水に懸濁し、2 分間ソニケーションを行なつた後、3000 r.p.m. で 10 分間遠心し、菌体を分離した。菌体に蒸留水を加え再び懸濁し、UV 照射 (15 ワット、15 cm の高さで) した後、常法により凍結乾燥した。

試験例 3 抗腫瘍性試験

エールリツヒ腹水癌細胞をマウスの腹腔内に接種し、1 日後より 3 日間、実施例 2 で得られた不活化菌体 $100 \mu\text{g}$ /日を生理食塩水に懸濁して腹腔内に投与した。対照として生理食塩水のみを腹腔内投与したマウスは 30 日以内に全て癌死した。一方、不活化菌体を投与したマウスの 50% は完全に治癒し、残り 50% には延命効果が認められた (癌接種後 100 日目で判定)。

- 7 -

[発明の効果]

以上のように、本発明によれば優れた抗腫瘍性を有し、かつ安全性の高い抗腫瘍剤が提供される。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、癌細胞移植マウスに本発明の抗腫瘍剤を投与した群とコントロール群の腫瘍の大きさの変化を示すグラフである。

以上

出願人 株式会社 薬



代理人 弁理士 有賀 三幸



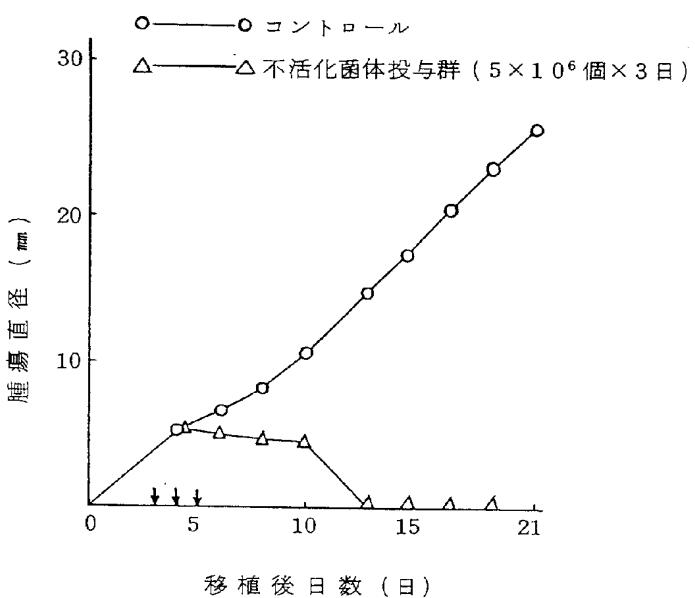
弁理士 高野 登志雄



弁理士 小野 信夫

- 8 -

第 1 図



手 続 補 正 書 (自 発)

昭和 63 年 2 月 16 日

特許庁長官 小川邦夫 殿



1. 事件の表示

昭和 63 年特許願第 3299 号

2. 発明の名称

抗腫瘍剤

3. 補正をする者

事件との関係 出願人
名 称 株式会社 科 薬

4. 代理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 (〒103)
共同ビル 電話 (669) 0904 代

氏 名 (6870) 弁理士 有賀 三 幸

住 所 同 上

氏 名 (7756) 弁理士 高野 登志雄

住 所 同 上

氏 名 (8632) 弁理士 小野 信夫

5. 補正命令の日付

自 発



特許請求の範囲

1. リステリア・モノチトゲネス (Listeria monocytogenes) EGD 株または U-T 株の生菌体の感染能を不活化してなる抗腫瘍剤。
2. 不活化が、生菌体をペニシリソ処理することにより行なわれたものである特許請求の範囲第 1 項記載の抗腫瘍剤。
3. 不活化が、生菌体をクロロフォルム処理及びソニケーション処理に付すことにより行なわれたものである特許請求の範囲第 1 項記載の抗腫瘍剤。

6. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」および「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書の「特許請求の範囲」を別紙の如く訂正する。

(2) 明細書中、第 3 頁第 4 ~ 5 行
「リステリア・モノサイトゲネス」とあるを
「リステリア・モノチトゲネス」と訂正する。

(3) 同第 3 頁第 6 行

「4 b 株」とあるを
「U-T 株」と訂正する。

- 2 -